

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2000060558
PUBLICATION DATE : 29-02-00
APPLICATION DATE : 12-08-98
APPLICATION NUMBER : 10228457

APPLICANT : BIO ORIENTED TECHNOL RES
ADVANCEMENT INST;

INVENTOR : KASUGA YOSHIE;

INT.CL. : C12N 15/09 A01H 5/00 C07K 14/415
C12N 1/19 C12N 1/21 C12P 21/02
C12Q 1/68 //(C12N 15/09 , C12R
1:91), (C12N 1/19 , C12R 1:865),
(C12N 1/21 , C12R 1:19), (C12P
21/02 , C12R 1:19), (C12P 21/02
, C12R 1:865)

TITLE : GENE ENCODING TRANSCRIPTION
FACTOR OF PLANT

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a recombinant protein useful for making a stress
resistant plant having resistance to dryness, coldness or salt by encoding a protein having
a specific amino acid sequence.

SOLUTION: This recombinant protein is (A) a protein having the amino acids sequence of
formula I or II, or is (B) a protein (except CBF1 protein) including up to a certain integer
number of amino acid alterations as compared to the above sequence which are selected
from a group consisting of at least one amino acid deletion, substitution or addition, and
controlling the transcription of genes located in a downstream position of a stress
response element. It is pref. to produce the protein by incubating a transformant including
a recombinant vector having a transcription factor gene encoding the protein in culture
medium and by collecting a protein controlling the transcription of genes located in a
downstream position of a stress response element or activating the transcription of genes
located in a downstream position of DRE.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
1 5 10 15
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser
20 25 30

Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp
195 200 205
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
210 215

I

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
1 5 10 15
Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys Leu Ala Thr Ser
20 25 30

Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp Val Glu Gly Asp
195 200 205
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
210 215

II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-60558

(P2000-60558A)

(43) 公開日 平成12年2月29日 (2000.2.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 0 7 K 14/415	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
1/21		1/21	4 B 0 6 5

審査請求 有 請求項の数13 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-228457

(22) 出願日 平成10年8月12日 (1998.8.12)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年5月1日 日本植物生理学期誌1998年度年会準備委員会発行の「日本植物生理学会1998年度年会および第38回シンポジウム講演要旨集」に発表

(71) 出願人 591286568

農林水産省国際農林水産業研究センター所長

茨城県つくば市大わし1-2

(71) 出願人 000195568

生物系特定産業技術研究推進機構
埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2

(72) 発明者 篠崎 和子

茨城県稲敷郡茎崎町高見原2-4-15

(72) 発明者 春日 美江

茨城県つくば市並木2-14-301-501

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物の転写因子をコードする遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 植物の転写因子をコードする遺伝子。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする転写因子遺伝子。(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【請求項2】 ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする転写因子遺伝子。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【請求項4】 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号7、又は配列番号9で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1、配列番号3、配列番号7、又は配列番号9で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNA

【請求項5】 ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項3又は4記載の遺伝子。

【請求項6】 請求項3～5のいずれか1項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項7】 請求項6記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項8】 請求項3～5のいずれか1項に記載の遺伝子を含むトランスジェニック植物。

【請求項9】 請求項7記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質を採取することを特徴とする、該タンパク質の製造方法。

【請求項10】 請求項3～5のいずれか1項に記載の遺伝子の植物体内における転写レベルを測定することを特徴とする植物のストレスレベルの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該遺伝子を含むトランスジェニ

ック植物、該形質転換体を用いる前記タンパク質の製造方法、植物のストレスレベルの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子の転写は、RNAポリメラーゼにより行われる。RNAポリメラーゼは二本鎖DNAを鋳型に、プライマー非依存的にリボスクレオシドリン酸を3'の方向に向かって重合する。例えば、大腸菌の場合、RNAポリメラーゼは、 β' β α ω のコア酵素に、プロモーター認識能をもつ σ 因子が結合したホロ酵素の形をとり、転写の開始と伸長を起こし、 ρ 因子の結合によって終結に至る。一方、真核生物の場合、RNAポリメラーゼは、I型、II型、III型の3つのクラスに分けられ、いずれも10種類以上のサブユニットから構成される複雑な構造をとっており、I型はrRNA、II型はmRNA前駆体、III型はtRNA及び5SrRNAをそれぞれ選択的に転写する。このようなRNAポリメラーゼによるRNAの合成量は、細胞の増殖ステージや外部環境の変化に応じて様々に変動し、この変動にはRNAポリメラーゼの転写開始を正又は負に制御する転写因子が深く関与している。

【0003】 一般に、細胞は、温度・圧力・酸素・光・放射線・金属イオン・有機化合物などを含む多くの因子からなる外部環境に曝されて生存している。これら外部環境が変動すると、細胞は、それをストレスとして感知し特有の応答を示す。例えば、細胞は高温に対して、熱ショック応答と呼ばれる反応を示し、これにより一群の熱ショックタンパク質(HSP; heat shock protein)が発現誘導される。HSPは、熱によって変成したタンパク質の不可逆的沈殿を防止し、それらの再生を助ける分子シャペロン機能を有し、熱ストレスから細胞を守る働きをしている。この熱ショック応答の発現には、ヒト、アフリカツメガエル、ショウジョウバエなどにおいては、熱ショック因子(HSF; heat shock factor)と呼ばれる転写因子が重要な役割を果たしていることが知られている〔永田和宏：細胞工学、10:348-356(1991)〕。HSFは熱ショックにより活性化され、HSPをコードする遺伝子(熱ショック遺伝子ともいう)の上流にある熱ショックエレメント(HSE; heat shock element)に結合し、熱ショック遺伝子の転写を促進する。

【0004】 一方、植物においても、乾燥・低温・冷凍・塩ストレスなどのストレス状態に置かれると、細胞内に、LEAタンパク質、水チャネルタンパク質、適合溶質の合成酵素などのストレスタンパク質を誘導し、自身の細胞をそれらのストレスから防御していることが報告されている。しかし、その転写を調節している転写因子については、未解明な点が多く残されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ストレス応答性の遺伝子発現の制御に必須のストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換え

ベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該遺伝子を含有するトランスジェニック植物、該形質転換体を用いる前記タンパク質の製造方法、植物のストレスレベルの測定方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、低温耐性植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を活性化する転写因子をコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【0008】さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする転写因子遺伝子である。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号8、又は配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【0009】さらに、本発明は、以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子である。

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号7、又は配列番号9で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1、配列番号3、配列番号7、又は配列番号9で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNAとで、上記ストレスとしては、例えば乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスが挙げられる。

【0010】さらに、本発明は、上記遺伝子を含有する組換えベクターである。さらに、本発明は、上記組換えベクターを含む形質転換体である。さらに、本発明は、上記遺伝子を含有するトランスジェニック植物である。さらに、本発明は、上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質を採取することとを特徴とする、該タンパク質の製造方法である。さらに、本発明は、上記遺伝子の植物体内における転写レベルを測定することとを特徴とする植物のストレスレベルの測定方法で

ある。以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の遺伝子は、低温、乾燥、塩などの環境ストレスにより発現されるストレス応答性タンパク質をコードする遺伝子の下流に存在するシスエレメントに結合して、転写を活性化するタンパク質(転写因子ともいう)をコードする遺伝子である。前記シスエレメントには、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE: dehydration-responsive element)、アブシジン酸応答性エレメント(ABRE: abscisic acid responsive element)、低温ストレス応答性エレメントなどがある。本発明の遺伝子がコードするタンパク質は、前記ストレス応答性エレメントの下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有するものである。本発明においては、DRE結合タンパク質をコードする遺伝子を例に説明する。以下、本発明の遺伝子を、DRE結合タンパク質1A遺伝子(DREB1A遺伝子ともいう)、DRE結合タンパク質1C遺伝子(DREB1C遺伝子ともいう)、DRE結合タンパク質2A遺伝子(DREB2A遺伝子ともいう)、及びDRE結合タンパク質2B遺伝子(DREB2B遺伝子ともいう)という。

【0012】1. 本発明の遺伝子のクローニング

(1) シロイヌナズナのmRNA及びcDNAライブラリーの調製
mRNAの供給源としては、シロイヌナズナの葉、茎、根、花など植物体の一部又は植物体全体が挙げられる。また、シロイヌナズナの種子をGM培地、MS培地、 $\frac{1}{2}$ MS培地などの固体培地に播種し、無菌条件下で生育させた植物体も用いることができる。本発明のDREB1A遺伝子のシロイヌナズナ植物体中のmRNAレベルは、植物体を低温ストレス(例えば、10 \sim -4 $^{\circ}$ C)に曝露することにより増大する。一方、本発明のDREB2A遺伝子のmRNAレベルは、植物体を塩ストレス(例えば、150 \sim 250mM NaCl)や乾燥ストレス(例えば、脱水状態にする)に曝露することにより増大するため、シロイヌナズナをこれらのストレスに曝露させた植物体を用いてもよい。

【0013】mRNAの調製は、例えば、GM培地で生育させたシロイヌナズナの植物体を、低温ストレス、乾燥ストレス、又は塩ストレスに曝露後、液体窒素で凍結する。その後は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、凍結した植物体を乳鉢などで摩砕後、得られた摩砕物から、グリオキザール法、グアニジンチオシナネート-塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテイナーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより粗RNA画分を抽出調製する。次いで、この粗RNA画分から、オリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリ-リセファロースなどを用いたアフィニティーカラム法、あるいはバッチ法によりポリ(A)-RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法などによりmRNAをさらに分画してもよい。

【0014】このようにして得られたmRNAを鋳型として、市販のキット(例えば、ZAP-cDNA Synthesis Kit(STR

ATAGENE社製))を用い、オリゴdT₂₉及び逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。次いで、得られた二本鎖cDNAにEcoRI-NotI-BamHIアダプターなどの適切なアダプターを付加後、転写活性化ドメイン(例えばGAL4活性化ドメインなど)を含むプラスミド(例えばpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)など)の転写活性化ドメインの下流に連結することにより、cDNAライブラリーを作製することができる。

【0015】(2)本発明の遺伝子のクローニングに用いる宿主

本発明の遺伝子をクローニングする方法としては、酵母を用いるワンハイブリッドスクリーニング法を挙げることができる。該スクリーニング法によるスクリーニングは、市販のキット(例えばMATCHMAKERワンハイブリッドシステム(Clontech社製))を用いて行うことができる。上記キットを用いて、本発明の遺伝子をクローニングする場合、キットに添付のプラスミドpHISi-1及びpLacZiに本発明の転写因子が結合するDREを含むDNAを連結したプラスミドを構築し、該プラスミドを添付の酵母(*Saccharomyces cerevisiae* YM4271)に形質転換したクローニング用宿主酵母を作製することが必要である。

【0016】クローニング用宿主酵母は、HIS3最小プロモーターの作用でリーキー(leaky)に発現されるHIS3タンパク質の作用によりヒスチジンを生合成することができるため、ヒスチジン非存在下でも生育可能である。しかし、HIS3タンパク質をコードする遺伝子の発現に用いられているプロモーターは最低限の転写水準しか維持することのできない最小プロモーターであるため、細胞内に生成されるタンパク質は非常に微量である。従って、HIS3タンパク質の競合阻害剤である3-AT(3-アミノトリアゾール)存在下で前記宿主酵母を培養した場合、細胞内のHIS3タンパク質の機能は、濃度依存的に3-ATによって阻害され、ある濃度以上の3-AT存在下では、細胞内のHIS3タンパク質は機能することができなくなり、前記宿主酵母はヒスチジン非存在下で生育不能となる。

【0017】また、lacZ遺伝子も、CYC1最小プロモーターの下流に存在するため、細胞内に生成されるβ-ガラクトシダーゼは非常に微量であり、前記宿主酵母をX-gal含有プレートに播種した場合、出現したコロニーは、コロニー全体が青色になるほどのX-gal分解能は有さない。しかし、宿主酵母中にHIS3遺伝子及びlacZ遺伝子上流のDREに結合し転写を活性化する転写因子が発現されると、宿主酵母は、3-AT存在下でも生育可能となり、かつX-galは分解されコロニーは青色となる。

【0018】ここで、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE: dehydration responsive element)は、乾燥ストレスや低温ストレスに曝露された場合に発現される遺伝子上流に存在する9bpの保存的な配列5'-TACCGACAT-3'からなるシス作動性のDNA領域をいう。

【0019】DREを含むDNA領域は、乾燥ストレス耐性遺伝子の1つであるrd29A遺伝子[Kazuko Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki: The Plant Cell 6: 251-264(1994)]のプロモーター領域(rd29A遺伝子の翻訳開始点から-215~-145の領域)を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCRともいう)を行い、増幅することにより得ることができる。ここでPCRに用いることができる鋳型DNAとしては、シロイヌナズナのゲノムDNAが挙げられる。またセンスプライマーとしては、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTTGAAAGAAA-3'(配列番号11)、アンチセンスプライマーとしては、5'-AAGCTTAAGCTTGCTTTTGGAACTCATGTC-3'(配列番号12)を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

【0020】(3) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

本発明のDREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子は、上記(1)において得られたcDNAライブラリーを、上記(2)において得られた宿主に、酢酸リチウム法などにより形質転換後、該形質転換体をX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)及び3-AT(3-アミノトリアゾール)を含有するLB培地プレートなどに播種・培養後、該プレート上に出現した青色のコロニーからプラスミドを単離することにより得ることができる。

【0021】すなわち、本発明のDREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子を含むポジティブクローンは、GAL4活性化ドメイン(GAL4 AD)をコードするDNA領域とDRE結合タンパク質をコードする領域との融合遺伝子を保有し、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターの制御下で、DRE結合タンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質(ハイブリッドタンパク質)を発現する。次いで、発現された融合タンパク質は、DRE結合タンパク質部分を介して、レポーター遺伝子上流のDREに結合し、次いでGAL4活性化ドメインがlacZ遺伝子及びHIS3遺伝子の転写を活性化する。それにより、ポジティブクローンは、著量のHIS3タンパク質及びβ-ガラクトシダーゼを生成する。従って、ポジティブクローンは、生成されたHIS3タンパク質の作用により3-AT存在下でもヒスチジンを生合成することができるため3-AT存在下で生育可能となるとともに、生成されたβ-ガラクトシダーゼの作用による培地中のX-galの分解によりコロニーは青色を呈する。

【0022】次いで、このようなコロニーからシングルセルアイソレーションを行った後、単離された細胞を培養し、得られる培養細胞からプラスミドDNAを精製することにより、本発明のDREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子を得ることができる。

【0023】(4) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモログ

生物は、1つの遺伝子から進化したと考えられる塩基配列の類似した遺伝子を有していることがある。そのような遺伝子がコードするタンパク質は、互いにホモログ

といわれ、既に塩基配列が判明している遺伝子の一部をプローブとして、遺伝子ライブラリーの中からクローニングすることができる。本発明においては、シロイヌナズナのcDNAライブラリーの中から、上記(3)において得られたDREB1AcDNA又はDREB2AcDNAをプローブとしてそれらのホモログをコードする遺伝子をクローニングすることができる。

【0024】(5) 塩基配列の決定

上記(3)及び(4)において得られたプラスミドよりcDNA部分を制限酵素で切断し、pSK(Stratagene社製)などの適切なプラスミドに連結してサブクローニングした後、全塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法などの公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機(例えばPEKKIN-ELMER社製373A DNAシーケンサーなど)を用いて配列決定が行われる。

【0025】配列番号1、3、7及び9に本発明の遺伝子の塩基配列を、配列番号2、4、8及び10に本発明のタンパク質のアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に欠失、置換、付加などの変異が生じてもよい。

【0026】例えば、配列番号2、4、8又は10で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～160個程度、さらに好ましくは1～40個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

【0027】また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも本発明の遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ホルムアミド濃度が30～50%、好ましくは50%であり、温度が37～50℃、好ましくは42℃での条件をいう。なお、本発明の遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法などの公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製)など)を用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。

【0028】一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAないしゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダ

イズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。なお、本発明の組換えベクターは、大腸菌K-12株に導入され、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成10年8月11日付けで、FERM P-16936(DREB1A遺伝子導入株)及びFERM P-16937(DREB2A遺伝子導入株)として寄託されている。

【0029】2. 本発明のタンパク質のDRE結合能及び転写活性化能の測定

(1) DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDRE結合能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合能は、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質を用い、ゲルシフトアッセイ[Urao, T et al.: Plant Cell 5:1529-1539(1993)]を行うことにより確かめることができる。ここで、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質は、DREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子をコードするプラスミド(例えば、pGEX-4T-1ベクター(Pharmacia社製)など)のGSTコード領域の下流にフレームを合わせて連結し、該プラスミドを大腸菌に形質転換後、誘導条件下で大腸菌培養後、該大腸菌から精製することにより得ることができる。

【0030】ゲルシフトアッセイは、DNAとタンパク質との相互作用を調べる方法であり、³²Pなどで標識したDREを含むDNA断片と前記融合タンパク質とを混合してインキュベーションした後、該混合物を電気泳動し、ゲルを乾燥後、オートラジオグラムをとり、DNA断片とタンパク質との結合に起因する遅れて泳動されたバンドを検出する方法である。本発明において、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることは、DRE配列に変異を加えたDNA断片を用いた場合に、前記のバンドが検出されないことを明らかにすることにより確認することができる。

【0031】(2) 本発明のタンパク質の転写活性化能の解析

本発明のタンパク質の転写活性化能は、シロイヌナズナのプロトプラストの系を用いるトランスアクリベーション実験法を用いることにより解析することができる。例えば、DREB1A cDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミド(Clonetech社製)に連結し、エフェクタープラスミドを構築する。一方、上記1の(2)において得られるDREを含む71塩基のDNA領域を3カセット結合したDNA断片を、 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子上流のTATAプロモーターのさらに上流に連結し、レポータープラスミドを構築する。次いでこの2種のプラスミドをシロイヌナズナのプロトプラストに導入した後、GUS活性を測定する。ここでDREB1Aタンパク質を同時に発現させることにより、GUS活性の上昇が見られれば、プロトプラスト内で発現したDREB1Aタンパク質が、DREの配列を介

して転写を活性化していることがわかる。

【0032】本発明において、プロトプラストの調製及び該プロトプラストへのプラスミドDNAの導入は、Abelらの方法[Abel, S.: Plant J. 5:421-427(1994)]により行うことができる。また、実験ごとのプラスミドDNAの導入効率の差による実験誤差を最小限にするため、上記2種のプラスミドとともに、CAMV35Sプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドをプロトプラストに導入し、ルシフェラーゼ活性に対する β -グルクロニダーゼ活性を測定し、得られた測定値を転写活性化能の値とすることができる。 β -グルクロニダーゼ活性は、Jeffersonらの方法[Jefferson, R. A.: EMBO J. 83:8447-8451(1986)]により、ルシフェラーゼ活性はPicaGeneルシフェラーゼアッセイキット(Toyo-Ink社製)を用いることにより測定することができる。

【0033】3. 組換えベクター及び形質転換体の作製
(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNAなどが挙げられる。プラスミドDNAとしては、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119などの大腸菌宿主用プラスミド、pUB110、pTP5などの枯草菌用プラスミド、YEp13、YEp24、YCp50などの酵母宿主用プラスミド、pBI221、pBI121などの植物細胞宿主用プラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしては λ ファージなどが挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0034】ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)などを含有するものを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。

【0035】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるもので

はない。例えば、エッシャーヒア・コリ(*Escherichia coli*)などのエッシャーヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)などのバチルス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)などのシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ(*Rhizobium meliloti*)などのリゾビウム属に属する細菌が挙げられ、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ボンベなどの酵母が挙げられ、シロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、イネ、ニンジンなどから株化した植物細胞や該植物から調製したプロトプラストが挙げられ、COS細胞、CHO細胞などの動物細胞が挙げられ、あるいはSf9、Sf21などの昆虫細胞が挙げられる。

【0036】大腸菌などの細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシャーヒア・コリ(*Escherichia coli*)HMS174(DE3)、K12、DH1などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)MI 114、207-21などが挙げられる。

【0037】プロモーターとしては、大腸菌などの宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_{λ} プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。lacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110-2114 (1972)]、エレクトロポレーション法などが挙げられる。

【0038】酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ボンベ、ヒシア・バストリス(*Pichia pastoris*)などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどが挙げられる。

【0039】酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194:182-187 (1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Aca

d. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978)], 酢酸リチウム法[Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163-168 (1983)]などが挙げられる。

【0040】植物細胞を宿主とする場合は、例えばシロイヌナズナ、タバコ、トウモロコシ、イネ、ニンジンなどから株化した細胞や該植物から調製したプロトプラストが用いられる。この場合、プロモーターとしては植物中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAプロモーター、r d29A遺伝子プロモーター、rbcSプロモーターなどが挙げられる。

【0041】植物への組換えベクターの導入方法としては、Abelらのポリエチレングリコールを用いる方法(Abel, H. et al. Plant J. 5: 421-427 (1994)]やエレクトロポレーション法などが挙げられる。動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーターなどが用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーターなどを用いてもよい。

【0042】動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法などが挙げられる。昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

【0043】4. 本発明のタンパク質の生産
本発明のタンパク質は、本発明の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつストレス応答性エレメント下流の転写を制御する機能を有するものである。なお、DREB1A遺伝子がコードするタンパク質をDREB1Aタンパク質といい、DREB1B遺伝子がコードするタンパク質をDREB1Bタンパク質といい、DREB1C遺伝子がコードするタンパク質をDREB1Cタンパク質といい、DREB2A遺伝子がコードするタンパク質をDREB2Aタンパク質といい、DREB2B遺伝子がコードするタンパク質をDREB2Bタンパク質ともいう。

【0044】本発明のタンパク質は、前記形質転換体を培地に培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0045】大腸菌や酵母菌などの微生物を宿主として

得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。また植物細胞を宿主として用いている場合には、必要に応じて、培地にチアミン、ピリドキシンなどのビタミン類を添加し、動物細胞を宿主として用いている場合には、RPMI 1640などの血清を添加する。

【0046】炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプンなどの炭水化物、酢酸、プロピオン酸などの有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステアーアリカーなどが用いられる。

【0047】無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどが用いられる。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、37℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは7.0～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液などを用いて行う。

【0048】培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)などを、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)などを培地に添加してもよい。

【0049】培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより該タンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離などにより菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを単独で又は適宜組み合わせ用いることにより、前記培養物から本発明のDREB1Aタンパク質、DREB1Cタンパク質、DREB2Aタン

パク質、又はDREB2Bタンパク質を単離精製することができる。

【0050】5. 本発明の遺伝子を導入したトランスジェニック植物の作製

遺伝子工学的手法を用いて本発明のタンパク質をコードするDNAを植物宿主に導入することにより、環境ストレス、特に、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレスなどに対して抵抗性を有するトランスジェニック植物を作製することができる。本発明の遺伝子の植物宿主への導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リボソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。アグロバクテリウム感染法を用いる場合、以下のようにして本発明の遺伝子導入植物を作製することができる。

【0051】(1) 植物導入用組換えベクターの作製及びアグロバクテリウムの形質転換

植物導入用組換えベクターは、前記1. において得られたDREB1A遺伝子、DREB1C遺伝子、DREB2A遺伝子、又はDREB2B遺伝子を含むDNAを適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入することにより得ることができる。クローニング用ベクターとしては、pBI2113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドやpLGV23Neo、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

【0052】バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・チュメファシエンスC58、LBA4404、EHA101、C58C1Rif^r、EHA105等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入用に用いる。

【0053】上記の方法以外にも、本発明においては、三者接合法(Nucleic Acids Research, 12: 8711(1984))によって本発明の遺伝子を含む植物感染用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド(例えばpRK2013など)を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養することにより植物感染用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

【0054】植物体内で外来遺伝子などを発現させるためには、構造遺伝子の前後に、それぞれ植物用のプロモーターやターミネーターなどを配置させる必要がある。本発明において利用可能なプロモーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の35S転写物(Jefferson, R.A. et al.: The EMBO J 6:3901-3907

(1987))、トウモロコシのユビキチン[Christensen, A. H. et al.: Plant Mol. Biol. 18:675-689(1992)]、ノバリン合成酵素(NOS)遺伝子、オクトピン(OCT)合成酵素遺伝子のプロモーターなどが挙げられ、ターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノバリン合成酵素遺伝子由来のターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているプロモーターやターミネーターであればこれらのものに限定されるものではない。

【0055】ここで、用いるプロモーターが目的遺伝子の構成的発現を担うプロモーター(CaMV35Sプロモーターなど)で、これによって、遺伝子導入植物に生長の遅れや矮化が生じる場合は、目的遺伝子の一過性の発現をもたらすようなプロモーター(例えば、rd29A遺伝子プロモーターなど)を用いることができる。また、必要に応じてプロモーター配列と本発明の遺伝子の間に、遺伝子の発現を増強させる機能を持つイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ(Adh1)のイントロン[Genes & Development 1:1183-1200(1987)]を導入することができる。

【0056】さらに、効率的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子を本発明の遺伝子と併用することが好ましい。その際に使用する選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ(hpt)遺伝子及びビアラホス(bialaphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子等から選ばれる1つ以上の遺伝子を使用することができる。本発明の遺伝子及び選択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

【0057】(2) 植物宿主への本発明の遺伝子の導入
本発明において、植物宿主とは、植物培養細胞、栽培植物の植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、又は植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)のいずれをも意味するものである。植物宿主として用いることができる宿主としては、シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどが挙げられる。植物培養細胞、植物体、植物器官又は植物組織を宿主とする場合、本発明のタンパク質をコードするDNAは、採取した植物切片にベクターをアグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、又はポリエチレングリコール法などで導入し、植物宿主を形質転換することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入して形質転換植物を作製することもできる。

【0058】アグロバクテリウム感染法により遺伝子を導入する場合、目的の遺伝子を含むプラスミドを保有す

るアグロバクテリウムを植物に感染させる工程が必須であるが、これは、バキュームインフィルトレーション法[CR Acad. Sci. Paris. LifeScience. 316 :1194(1993)]により行うことができる。すなわち、シロイヌナズナをバーミキュライトとパーライトを等量ずつ合わせた土で生育させたシロイヌナズナに、本発明の遺伝子を含むプラスミドを含むアグロバクテリウムの培養液に直接のシロイヌナズナを浸し、これをデシケーターに入れバキュームポンプで65～70mmHgになるまで吸引後、5～10分間、室温に放置する。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保つ。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を収穫する。

【0059】次いで、種子を目的の遺伝子を保有する個体を選択するために、適切な抗生物質を加えたMS寒天培地に播種する。この培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し、生育させることにより、本発明の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物の種子を得ることができる。一般に、導入遺伝子は宿主植物のゲノム中に同様に導入されるが、その導入場所が異なることにより導入遺伝子の発現が異なるホジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。プローブとして導入遺伝子のDNA断片を用いたノーザン法で検定することによって、より導入遺伝子が強く発現している形質転換体を選択することができる。

【0060】本発明の遺伝子を導入したトランスジェニック植物及びその次世代に目的の遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法又はサザン分析を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

【0061】(3) 本発明の遺伝子の植物組織での発現レベル及び発現部位の分析

本発明の遺伝子を導入したトランスジェニック植物における該遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、これらの細胞及び組織から常法に従ってRNAを抽出し、公知のRT-PCR法又はノーザン分析を用いて導入した遺伝子のmRNAを検出することにより行うことができる。また、本発明の遺伝子産物を、該遺伝子産物に対する抗体を用いたウエスタン分析等により直接、分析することによっても行うことができる。

【0062】(4) 本発明の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内における各種遺伝子のmRNAレベルの変化

本発明の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内において、本発明の転写因子の作用により、発現レベルが変化したと考えられる遺伝子はノーザン法によって同定することができる。ノーザン法は、本発明の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物と導入されていない植物とを用いて、遺伝子の発現を比較することによって検定することができる。

【0063】例えば、GM寒天培地などで育てた植物に、所定期間(例えば1～2週間)の乾燥及び/又は低温ストレスを与える。乾燥ストレスの負荷は、寒天培地から植物体を、抜き取り濾紙上で10分～24時間乾燥させることにより与えることができる。一方、低温ストレスの負荷は、15～-4℃に10分～24時間保持することにより与えることができる。ストレスを与えないコントロール植物と乾燥及び低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して電気泳動を行い、ノーザン分析又はRT-PCRによって発現している遺伝子を検定する。

【0064】(5) トランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性の評価

本発明の遺伝子を導入したトランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性は、バーミキュライト、パーライトなどを含む土を入れた植木鉢にトランスジェニック植物を植え、乾燥・低温・凍結などの各種ストレスを負荷した場合の生存を調べることによって評価することができる。例えば、乾燥ストレスに対する耐性は、2～4週間、水を与えずその生存を調べることにより、また凍結ストレスに対する耐性は、-6～-10℃に、5～10日間置いた後、5～10日間、20～25℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。

【0065】6. 本発明のタンパク質に対する抗体
本発明においては、本発明のタンパク質に対する抗体を作製することもできる。「抗体」とは、抗原である本発明のタンパク質に結合し得る抗体分子全体またはその断片(例えば、FabまたはF(ab')₂断片)を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本発明のタンパク質に対する抗体は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である[例えばSambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)を参照]。

【0066】(1) 本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体の作製

前記のようにして、遺伝子工学的に作製した本発明のタンパク質又はその断片を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いるときは100～200μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバントなどが挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内などに注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは1週間間隔で、1～5回、好ましくは5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から7～10日後に、酵素免疫測定法(EIA: enzyme immunoassay)、放射性免疫測定法(RIA: radioimmuno assay)などで抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。抗血清から抗体

の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0067】(2) 本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

(i) 抗体産生細胞の採取

前記のように、遺伝子工学的に作製した本発明のタンパク質又はその断片を抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いるときは100～200 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバントなどが挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは1～2週間間隔で、1～5回、好ましくは5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から7～10日後、好ましくは7日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞などが挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

【0068】(ii) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば P3X63-Ag.8.U1(P3U1)、Sp2/O、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0069】次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDME M、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 2×10^7 個の抗体産生細胞と 1×10^7 個のミエローマ細胞とを等容量混合し、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1,500ダルトンのポリエチレングリコールなどを使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0070】(iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイプレート上に0.8～1個/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換し

て培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、約10日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0071】次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法などによって行うことができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法などにより行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。

【0072】(iv) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法などを採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地などの動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37℃、5%CO₂濃度)で7～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0073】腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2週間後に腹水または血清を採集する。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0074】このようにしてポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体が得られた後は、これをリガンドとして、固体担体に結合させることによりアフィニティークロマトグラフィーカラムを作製し、そして該カラムを用い、前記の採取源又は他の採取源から、本発明のタンパク質を精製することができる。さらにこれらの抗体は本発明のタンパク質を検出するためにウエスタンブロッティングに用いることもできる。

【0075】7. 植物のストレスレベルの測定

本発明のDREB1A遺伝子は、主に低温ストレスにより、また本発明のDREB2A遺伝子は、主に乾燥ストレス及び塩ストレスにより転写が活性化されるため、本発明の遺伝子の転写レベルを調べることにより、植物の受けている低温・乾燥・塩などによるストレスのレベルを調べることができる。農作物をビニールハウスなどで栽培する場合、その照明費、暖房費、給水費、土壌など栽培に適する環境の設定コストは、生産コストの20～80%を占めている。そこで作物が、それら低温ストレス、乾燥ストレス、塩ストレスを受けているかどうかを迅速に確認することができれば、必要最小限の環境設定により、作物を栽培することが可能となり、農作物の生産コストを大幅

に削減することができる。

【0076】本発明の遺伝子の転写レベルは、RNAゲルブロット分析、定量的PCRなどにより行うことができる。RNAゲルブロット分析に用いることができるプローブとしては、DREB1A遺伝子用には、DREB1A遺伝子及び/又は該遺伝子に隣接するDREB1A遺伝子特異的な配列を含む100～1000bpの領域を、DREB2A遺伝子用には、DREB2A遺伝子及び/又は該遺伝子に隣接するDREB2A遺伝子特異的な配列を含む100～1000bpの領域を用いることができる、また定量的PCRに用いることができるプライマーとしては、DREB1A遺伝子用には、DREB1A遺伝子のコード領域内又はそれに隣接するDREB1A遺伝子特異的に増幅できる17～25bpのオリゴヌクレオチドが挙げられる。同様にDREB2A遺伝子用にも、DREB2A遺伝子のコード領域内又はそれに隣接するDREB2A遺伝子特異的に増幅できる17～25bpのオリゴヌクレオチドが挙げられる。そして上記の、プローブ又はプライマーは、DREB1A又はDREB2A遺伝子の転写レベルを測定するためのキットとして使用することができる。

【0077】

【実施例】以下に、本発明を実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

〔実施例1〕シロイヌナズナ植物体の栽培

LEHLEから入手したシロイヌナズナの種子を滅菌液(1%次亜塩素酸ナトリウム、0.02%Triton X-100)に15分間浸漬することにより滅菌し、次いで滅菌水により水洗後、GM寒天培地(1リットル当り：ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(日本製薬社製)4.6g、MES 0.5g、スクロース30g、寒天8g、pH 5.7)に、40～120粒播種した。そして約1000lux、16時間明期、8時間暗期の光条件下において、22℃で栽培することにより植物体を得た。

【0078】〔実施例2〕DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

(1)ポリ(A)-RNAの調製

実施例1において得た植物体を、4℃で24時間の低温処

ポリ(A)-RNA	5 μ l (5 μ g)
10×第1鎖合成反応用緩衝液	5 μ l
DEPC処理水	34 μ l
40単位/ μ lリボヌクレアーゼインヒビター	1 μ l
第1鎖用ヌクレオチドミックス	3 μ l
1.4 μ g/ μ lリンカープライマー	2 μ l
全量 50 μ l	

【0083】上記溶液に、逆転写酵素1.5 μ l (50単位/ μ l)を添加して、37℃で、1時間インキュベートすることにより一本鎖cDNAを合成した。次に、得られた一本鎖cD

一本鎖cDNA反応液	45 μ l
10×第2鎖合成用緩衝液	20 μ l
第2鎖用NTPミックス	6 μ l
1.5単位/ μ l RNase H	2 μ l

理を行った後、グリオキザール法により全RNAを調製した。すなわち、液体窒素により凍結したシロイヌナズナの植物体3gを、100mlの5.5M GTC溶液(5.5Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム、0.5%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)に懸濁し、ホモジェナイザーで素早く細胞を可溶化させた。このホモジェネートを、18-Gの注射針を取り付けた注射筒を用いて10回以上出し入れすることによりDNAを細断した後、4℃、12,000×gで15分間遠心し、細胞破片を沈殿させて除去した。

【0079】得られた上清をオートクレーブ済の遠心管に入れた17mlのCsTFA溶液(セシウムトリフルオロアセテート(Pharmacia社製)、0.25M EDTA、滅菌水を混合してD₂O=1.51に調整したもの)のクッション上に重層後、Beckman SW28ローター中15℃、25,000×rpmで24時間超遠心し、全RNAを沈殿させた。次いで得られた全RNAを600 μ lの4M GTC溶液(上記5.5M GTC溶液を滅菌水で希釈してGTC濃度が4Mとなるようにしたもの)に溶解し、エタノール沈殿を行うことにより全RNAを得た。

【0080】得られた全RNAを、2mlのTE/NaCl (TEと1M NaClを1:1の割合で混合したもの)に溶解し、既にTe/NaClで平衡化しておいたオリゴdTセルロースカラム(Collaborative research社製オリゴdTセルロース(type 3)をBio-Rad社製エコノカラム(直径0.6cm)に高さ1.5cmとなるように詰めたもの)に通し、通過した溶液をもう一度カラムに通した。次いで、約8mlのTE/NaClでカラムを洗浄後、TEを加えてポリ(A)-RNAを溶出・精製した。得られたRNAの量は、UV分光器により測定した。

【0081】(2) cDNAライブラリーの合成

上記(1)により得られたポリ(A)-RNA 5 μ gを用いて、cDNA合成キット(Stratagene社製)により二本鎖cDNAを合成後、該二本鎖cDNAをpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)に連結しcDNAライブラリーを合成した。すなわち、まず、キットに添付のプロトコルに従い、以下の反応溶液中で一本鎖cDNAを合成した。

【0082】

NAの反応液に、以下の試薬を順に加えた、

【0084】

45 μ l
20 μ l
6 μ l
2 μ l

9単位/ μ l DNAポリメラーゼI11 μ l

DEPC処理水

116 μ l全量 200 μ l

【0085】上記反応液を、16℃で2.5時間インキュベートすることにより二本鎖cDNAを合成した。合成した二本鎖cDNAを、Pfu DNAポリメラーゼ5単位を用い72℃で30分間インキュベートすることにより末端を平滑した。次いで、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、得られたペレットに9 μ lのEcoRI-NotI-BamHIアダプター(TAKARA社製)、1 μ lの10 \times リガーゼ緩衝液、1 μ lのATP、1 μ lのT4 DNAリガーゼ(4単位/ μ l)を加え、4℃で2日間インキュベートすることにより、二本鎖cDNAにアダプターを付加した。

【0086】次いで、両端にEcoRI制限酵素部位を有するcDNAを、クローニングベクターであるpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)のGAL4の活性化ドメインの下流のEcoRI部位に、T4DNAリガーゼを用いて連結することによりcDNAライブラリーを合成した。

【0087】(3) ゲノムDNAの調製

実施例1において得られた植物体から、Molecular Cloning[Maniatis, T. et al., Molecular Cloning:a Laboratory Manual, 187-198, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1982)]に記載の方法に従って、ゲノムDNAを調製した。すなわち、シロイヌナズナ植物体50gに2,000mlの破碎用緩衝液(0.35Mスクロース、1M Tris-HCl(pH8.0)、5mM MgCl₂、50mM KCl)を加えて、ワーリングブレンダーで1分間の粉碎を3回行うことによりホモジナイズした。

【0088】摩擦液を濾過することにより、細胞残渣を除去し、濾液を遠心管に分注し、スイングローターで3,000 \times g、4℃で10分間低速遠心した。遠心後、上清を捨て沈殿を氷冷した30mlの破碎用緩衝液に懸濁してから再度低速遠心した。緑色の沈殿が白くなるまで同じ操

ゲノムDNA溶液	5 μ l (100ng)
滅菌水	37 μ l
10 \times PCR緩衝液(1.2M Tris-HCl(pH8.0)、100mM KCl、60mM(NH ₄) ₂ SO ₄ 、1%Triton X-100、0.1mg/mlBSA)	5 μ l
50pmol/ μ lプライマー(センス)	1 μ l (50pmol)
50pmol/ μ lプライマー(アンチセンス)	1 μ l (50pmol)
KOD DNAポリメラーゼ(Kod-101, TOYOBO社製)	1 μ l (2.5単位)

全量 50 μ l

【0091】上記反応液を、よく混合後、ミネラルオイルを50 μ l重層した。PCRは、98℃で15秒間の熱変性、65℃で2秒間のアニーリング、74℃で30秒間の伸長反応の条件を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、クロロホルム50 μ lを加え混合し、4℃、15,000rpmで15分間遠心し、上層を新しいマイクロチューブに回収した。そこにエタノール100 μ lを加えよく混合後、4℃、15,000rpmで15分間遠心しPCR産物をペレット化した。得られたPCR産物をHindIIIで切断後ベクターpSKの

作を3回繰り返した。得られた白い沈殿を氷冷した10mlのTEに懸濁した後、10mlの溶解液(0.2M Tris-HCl(pH8.0)、50mM EDTA、2%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)を加えた。0.1mlのプロティナーゼK(10mg/ml)を加え細胞核を消化後、得られた消化液を、フェノール処理及びエタノール沈殿させた。次いで沈殿により得られるDNA繊維を3,000 \times g、5分間の遠心により回収し、これを1mlのTEに溶解してゲノムDNAを得た。

【0089】(4) 酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主の構築

本発明の転写因子をコードする遺伝子をクローニングするため、HIS3レポーター遺伝子又はlacZレポーター遺伝子上流に、DREモチーフを含むDNA領域をそれぞれ4カセット連結した2種類のプラスミドを含む、DRE結合タンパク質遺伝子クローニング用宿主を構築した(図1)。すなわち、まず、本発明の転写因子が結合するDRE配列を含む、rd29A遺伝子プロモーター領域(rd29A遺伝子の翻訳開始点から-215~-145の領域)をPCR法により増幅した。すなわち、センスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTTGAAAGAAA-3'(配列番号11)を、アンチセンスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTGCTTTTGGAACTCATGTC-3'(配列番号12)を合成した。ここで、これらのプライマーには、増幅後、PCR断片を容易にベクターに連結できるように、5'末端にHindIII切断部位を導入した。なお、これらの合成プライマーは、全自動DNA合成機(Perkin-Elmer社製)を使用して化学合成した。これらのプライマーを用い、上記(3)において調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRの反応液の組成は以下の通りである。

【0090】

ゲノムDNA溶液	5 μ l (100ng)
滅菌水	37 μ l
10 \times PCR緩衝液(1.2M Tris-HCl(pH8.0)、100mM KCl、60mM(NH ₄) ₂ SO ₄ 、1%Triton X-100、0.1mg/mlBSA)	5 μ l
50pmol/ μ lプライマー(センス)	1 μ l (50pmol)
50pmol/ μ lプライマー(アンチセンス)	1 μ l (50pmol)
KOD DNAポリメラーゼ(Kod-101, TOYOBO社製)	1 μ l (2.5単位)

全量 50 μ l

HindIII部位に連結し、この組換えプラスミドを大腸菌に形質転換した。形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定することにより、4回同じ方向にDNA断片が結合されたものを選抜した。

【0092】これをEcoRIとHincIIで切り出した後、得られたDNA断片を酵母の発現ベクターであるpHIS1-1(Clonetech社製)のHIS3最小プロモーター上流のEcoRI-MluI部位に連結した。また、同様に、DREを4カセット含むDNA断片をpSKからEcoRIとHincIIで切り出し、酵母の発現

ベクターpLacZi (Clontech社製) のlacZ最小プロモーターの上流のEcoRI-SalI部位に連結した。得られた2種のプラスミドを*Saccharomyces cerevisiae* YM4271 (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-903) (Clontech社製) に形質転換し、することにより、酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主を得た。(図1)。

【0093】(5) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

上記(2)において調製したcDNAライブラリーを用いて 1.2×10^6 の酵母の形質変換体をスクリーニングした。2種のポジティブクローンを得た。得られたcDNAをpAD-GAL4プラスミドよりEcoRIを用いて切り出し、pSKプラスミドのEcoRI部位に結合して、pSKDREB1A及びpSKDREB2Aを得た。

【0094】(6) 塩基配列の決定

このプラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aを用いて全塩基配列の決定を行った。シークエンスに用いたプラスミドはKURABO製の自動プラスミド調製機 Model PI-100を用いた。塩基配列決定のための反応は反应用ロッドPerkin Elmer製のCATALYST 800を塩基配列決定はPerkin Elmer製のシークエンサーModel 373Aを用いた。その結果プラスミドpSKDREB1AのcDNAは933塩基よりなり、オープンリーディングフレームの解析からDREB1A遺伝子がコードする遺伝子産物は216アミノ酸残基よりなる分子量約24.2キログルトンのタンパク質であった。5'末端から117番目のアデニンから766番目のチミンでコードされていた(配列番号1)。一方プラスミドpSKDREB2AのcDNAは1437塩基よりなり、オープンリーディングフレームの解析からDREB2A遺伝子がコードする遺伝子産物は335アミノ酸残基よりなる分子量約37.7キログルトンのタンパク質であった。

【0095】(7) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子の単離

上記(5)において得られたDREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子がコードするタンパク質のホモログをコードする遺伝子を単離した。すなわち、上記(5)において得られたDREB1A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片又はDREB2A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片をプローブとして、Molecular Cloning[Sambrook, J et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (1989)]に記載の方法に従い、シロイヌナズナの λ gt11 cDNAライブラリーから、ホモログをコードする遺伝子を単離した。DREB1Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子として、DREB1B遺伝子及びDREB1C遺伝子を、DREB2Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子としてDREB2B遺伝子を得た。塩基配列決定したところ、DREB1B遺伝子(配列番号5)はCBF1[Stockinger, E.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1035-1040 (1997)]と同一であった

が、DREB1C遺伝子(配列番号7)、DREB2B遺伝子(配列番号9)は新規であった。

【0096】オープンリーディングフレームの解析からDREB1C遺伝子がコードする遺伝子産物は216アミノ酸残基よりなる分子量約24.3キログルトンのタンパク質(配列番号8)であり、DREB2B遺伝子がコードする遺伝子産物は330アミノ酸残基よりなる分子量約37.1キログルトンのタンパク質(配列番号10)であった。

【0097】〔実施例3〕DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合能を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と該タンパク質との融合タンパク質を大腸菌を用いて調製し、ゲルシフトアッセイにより調べた。DREB1AcDNAの塩基配列の119番目から547番目の429塩基のDNA断片又はDREB2AcDNAの塩基配列の167番目から666番目の500塩基のDNA断片をPCRによって増幅後、該増幅断片をプラスミドpGEX-N-4T-1(ファルマシア)のEcoRI-SalI部位に結合した。これを大腸菌JM109に導入したのち、大腸菌を200 mlの2x YT培地(Molecular Cloning (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press)で培養して、これにプラスミドpGEX-N-4T-1の持つプロモーターを活性化させる1 mMのイソプロピル β -D-チオガラクトシドを加えDREB1AとGSTとの融合タンパク質の合成を誘導した。

【0098】タンパク質が誘導された大腸菌は13 mlの緩衝液(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM DTT, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)に溶かした後、1% Triton X-100と1 mM EDTAを加えた。細胞を超音波で破壊したのち22,000g、20分間遠心し、glutathione-Sepharose (Pharmacia製)を用いて精製した。融合タンパク質はDRE配列を含む32Pでラベルした71塩基のDNA断片をプローブとして室温で20 min保温した。これを0.25x Tris-borate-EDTAを含む6%アクリルアミドを用いて電気泳動を100 Vで2時間行った。このゲルシフト法で解析すると遅れて泳動するバンドが検出された。また、DRE配列に変異を加えたDNA断片をプローブとして用いた場合はこのバンドは検出されず、DREB1Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることが明らかになった(図2)。

【0099】〔実施例4〕DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDRE下流遺伝子の転写活性化能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質が、植物細胞内におけるDRE依存的な転写をトランスに活性化し得るかどうかを調べるため、シロイヌナズナの葉から調製したプロトプラストの系を用いて、トランスアクチベーション実験を行った。すなわち、まず、DREB1A又はDREB2AのcDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミドに連結することによりエフェクタープラスミドを構築した。

【0100】レポータープラスミドはDREの配列を含む71塩基の配列を三個結合したDNA断片をrd29A遺伝子の最

小限のTATAプロモーターと β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に結合した。この2種のエフェクタープラスミドとレポータープラスミドをシロイヌナズナのプロトプラストに導入したのち、GUS活性を測定した。DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質を同時に発現させるとGUS活性の上昇が見られ、DREB1Aタンパク質はDREの配列を介して転写を活性化している転写因子であることが示された(図3)。

【0101】〔実施例5〕

(1) 植物プラスミドの構築

上記のようにして得られたpSKDREB1A(10mg)をEcoRV(20ユニット)とSmaI(20ユニット)を用いて10mM TrisHCl(pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール/100mM NaCl中、37℃で2時間切断してDREB1A遺伝子を含む約0.9kbのDNA断片を得た。一方、プロモーターDNAを持つプラスミドpBI2113Not(10mg)をSmaIで10mM TrisHCl(pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール(DTT)/100mM NaCl中、37℃で2時間切断した。制限酵素で切断して得られたDREB1A遺伝子を含む0.9kbのDNA断片と切断したpBI2113Notを、T4DNAリガーゼ(2ユニット)と66mM TrisHCl(pH7.6)/6.6mM MgCl₂/10mM DTT/0.1mM ATP中で15℃、16時間処理して得られたDNAを大腸菌JM109に形質転換した後、プラスミドpBI35S:DREB1Aを得た。DREB1A遺伝子の方向性はプラスミドpBI35S:DREB1Aの結合部位の塩基配列決定を行いセンス方向に結合したものを選抜した。pBI2113Notプラスミド[pBI2113プラスミド[Plant Cell Physiology 37:49-59(1996)]]をSmaIとSacIで切断して、GUS遺伝子のコード領域を取り除き、これにSmaI-NotI-SacIポリリンカーを結合して作成したものである。この様にして得られた植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを大腸菌DH5aに形質転換した(図4)。

【0102】上記の植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを大腸菌DH5aとヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101、及びアグロバクテリウムC58をLB培地を用いて28℃でLB寒天培地上で24時間混合培養した。生育したコロニーを1mlのLB培地にかきとり懸濁した。この懸濁液10mlをリファンピシリン100mg/ml、及びカナマイシン20mg/mlを含むLB寒天培地に塗り、28℃で2日間培養して、接合体アグロバクテリウムC58(pBI35S:DREB1A)を得た。

【0103】(2) アグロバクテリウム感染法によるシロイヌナズナへの遺伝子導入

この接合体をリファンピシリン100mg/ml、及びカナマイシン20mg/mlを含むLB培地(10ml)中28℃で24時間培養した。さらに、この培養液を500mlのLB培地に加えて24時間培養した。この培養液を遠心して培地を除き、さらに250mlのLB培地に懸濁した。

【0104】一方、4から5本のシロイヌナズナをバーミキュライトとハーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9cmの植木鉢で6週間育てた。プラスミドpBI35S:DREB1Aを含むアグロバクテリウムのLB培養液に直接上記の

シロイヌナズナを浸して、これをデシケーターに入れバキュームポンプで650mmHgになるまで吸引後、そのまま10分放置した。鉢をトレーに移しラップで覆い温度を保った。次の日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を得た。種子は次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌後、選択用のMS培地にバンコマイシン100mg/ml、カナマイシン30mg/mlを加えた寒天培地に蒔いた。この培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し形質転換植物体の種子を得た。

【0105】(3) 導入遺伝子と導入遺伝子がコードする転写因子が発現を変化させた遺伝子の同定

形質転換体の導入遺伝子DREB1Aと導入遺伝子が発現を変化させたと考えられる遺伝子をノーザン分析で同定した。ノーザン分析においては、DREB1A遺伝子、rd29A遺伝子、kin1遺伝子、cor6.6遺伝子、cor6.6遺伝子、cor15a遺伝子、rd17遺伝子、erd10遺伝子、P5CS遺伝子、erd1遺伝子、rd22遺伝子、rd29B遺伝子の転写の活性化について調べた。ノーザン分析にはシロイヌナズナの形質転換体の他に形質転換していない植物を用いて遺伝子の発現を比較することで検定した。2gの3週間GM寒天培地で育てた植物に乾燥及び低温ストレスを与えた。乾燥ストレスとしては寒天培地から抜き取り濾紙上で5時間乾燥させた。低温ストレスとしては植物体を4℃に5時間保温した。ストレスを与えないコントロールの植物と上記乾燥と低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して、電気泳動を行いノーザン法で発現している遺伝子を検定した。一般に、形質転換体においては遺伝子は同様にゲノムに導入されるが、その導入場所が異なることから、導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。プローブとして導入遺伝子のDNA断片を用いるとこのノーザン法で検定するとより導入遺伝子が強く発現している形質転換体を選抜できた。また、プローブとしてストレス耐性に関与する遺伝子のDNA断片を用いるとDREB1A遺伝子を導入することで変化を示すストレス耐性遺伝子を明らかにすることができた(図5)。

【0106】〔実施例6〕乾燥・凍結耐性の発現

3週間バーミキュライトとハーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9cmの植木鉢で育てたシロイヌナズナの形質転換体を用いて乾燥・凍結耐性に関して検討した。形質転換体とコントロールとしてDREB1A遺伝子を含まないpBI121を形質転換したシロイヌナズナを用いて乾燥・凍結耐性を検討した。乾燥耐性の検討では2週間水を止めその生存を調べた。また凍結耐性では-6℃に2日間置いた後5日間22℃で生育させその生存率を調べた。その結果、コントロールではすべての植物が枯れてしまったが、DREB1A遺伝子を導入したトランスジェニック植物では高い生存率を示した(図6)。

【0107】

【発明の効果】本発明により、DREに結合しDRE下流の遺

伝子の転写を活性化するタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該遺伝子を含むするトランスジェニック植物、該形質転換体を用いる前記

タンパク質の製造方法が提供される。本発明は、ストレス耐性植物の作出に有用である。

【0108】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<:110>: Nobuyoshi Maeno, Director General, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

<:120>: Genes Encoding Plant Transcription factors

<:160>: 12

<:210>: 1

<:211>: 933

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (119)..(766)

<:400>: 1

```
cctgaactag aacagaaaga gagagaaact attatttcag caaacatac caacaaaaaa 60
gacagagatc ttttagttac cttatccagt ttcttgaaac agagtactct tctgatea 118
atg aac tca ttt tct gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag 166
Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
1 5 10 15
tct tgg gtt tcc tca ggc ggt gat tat att ccg acg ctt gcg agc agc 214
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser
20 25 30
tgc ccc aag aaa ccg gcg ggt cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac 262
Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His
35 40 45
cca ata tac aga gga gtt cgt cgg aga aac tcc ggt aag tgg gtt tgt 310
Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys
50 55 60
gag gtt aga gaa cca aac aag aaa aca agg att tgg ctc gga aca ttt 358
Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe
65 70 75 80
caa acc gct gag atg gca gct cga gct cac gac gtt gcc gct tta gcc 406
Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala
85 90 95
ctt cgt gcc cga tca gcc tgt ctc aat ttc gct gac tgg gct tgg aga 454
Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg
100 105 110
ctc cga atc ccg gaa tca act tgc gct aag gac atc caa aag gcg gcg 502
Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala
115 120 125
gct gaa gct gcg ttg gcg ttt cag gat gag atg tgt gat gcg acg acg 550
Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr
```



```

      130              135              140
gat cat ggc ttc gac atg gag gag acg ttg gtg gag gct att tac acg 598
Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr
145              150              155              160
gcg gaa cag agc gaa aat gcg ttt tat atg cac gat gag gcg atg ttt 646
Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe
      165              170              175
gag atg ccg agt ttg ttg gct aat atg gca gaa ggg atg ctt ttg ccg 694
Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro
      180              185              190
ctt ccg tcc gta cag tgg aat cat aat cat gaa gtc gac ggc gat gat 742
Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp
      195              200              205
gac gac gta tgg tta tgg agt tat taaaactcag attattatatt ccatttttag 796
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
      210              215
tacgatactt tttattttat tattattttt agatcctttt ttagaatgga atcttcatta 856
tgtttgtaaa actgagaaac gactgtaaat taaattgatt cagtttcagt ataaaaaaaa 916
aaaaaaaaaa aaaaaaaa 933

```

<:210>: 2

<:211>: 216

<:212>: PRT

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>: 2

```

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
  1              5              10              15
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser
      20              25              30
Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His
      35              40              45
Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys
      50              55              60
Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe
      65              70              75              80
Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala
      85              90              95
Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg
      100              105              110
Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala
      115              120              125
Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr
      130              135              140
Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr
145              150              155              160
Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe
      165              170              175
Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro
      180              185              190

```

Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp
 195 200 205
 Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
 210 215

<:210>: 3

<:211>: 1437

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (167)..(1171)

<:400>: 3

gctgtctgat aaaaagaaga ggaaaactcg aaaaagctac acacaagaag aagaagaaaa 60
 gatacagca agaagactaa acacgaaagc gatttatcaa ctgaaggaa gagactttga 120
 ttttcaaatt tegtcccta tagatttgtg tgtttctggg aaggag atg gca gtt 175
 Met Ala Val
 1
 tat gat cag agt gga gat aga aac aga aca caa att gat aca teg agg 223
 Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp Thr Ser Arg
 5 10 15
 aaa agg aaa tct aga agt aga ggt gac ggt act act gtg get gag aga 271
 Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val Ala Glu Arg
 20 25 30 35
 tta aag aga tgg aaa gag tat aac gag acc gta gaa gaa gtt tct acc 319
 Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu Val Ser Thr
 40 45 50
 aag aag agg aaa gta cct gcg aaa ggg tgg aag aag ggt tgt atg aaa 367
 Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met Lys
 55 60 65
 ggt aaa gga gga cca gag aat agc cga tgt agt ttc aga gga gtt agg 415
 Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg Gly Val Arg
 70 75 80
 caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gct gag atc aga gag cct aat cga 463
 Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn Arg
 85 90 95
 ggt agc agg ctt tgg ctt ggt act ttc cct act get caa gaa get get 511
 Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln Glu Ala Ala
 100 105 110 115
 tct get tat gat gag get get aaa get atg tat ggt cct ttg get cgt 559
 Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro Leu Ala Arg
 120 125 130
 ctt aat ttc cct cgg tct gat gcg tct gag gtt acg agt acc tca agt 607
 Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Ser
 135 140 145
 cag tct gag gtg tgt act gtt gag act cct ggt tgt gtt cat gtg aaa 655
 Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val His Val Lys
 150 155 160

aca gag gat cca gat tgt gaa tct aaa ccc ttc tcc ggt gga gtg gag 703
 Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly Gly Val Glu
 165 170 175
 ccg atg tat tgt ctg gag aat ggt gcg gaa gag atg aag aga ggt gtt 751
 Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys Arg Gly Val
 180 185 190 195
 aaa gcg gat aag cat tgg ctg agc gag ttt gaa cat aac tat tgg agt 799
 Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn Tyr Trp Ser
 200 205 210
 gat att ctg aaa gag aaa gag aaa cag aag gag caa ggg att gta gaa 847
 Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly Ile Val Glu
 215 220 225
 acc tgt cag caa caa cag cag gat tgc cta tct gtt gca gac tat ggt 895
 Thr Cys Gln Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala Asp Tyr Gly
 230 235 240
 tgg ccc aat gat gtg gat cag agt cac ttg gat tct tca gac atg ttt 943
 Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser Asp Met Phe
 245 250 255
 gat gtc gat gag ctt cta cgt gac cta aat ggc gac gat gtg ttt gca 991
 Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp Val Phe Ala
 260 265 270 275
 ggc tta aat cag gac cgg tac ccg ggg aac agt gtt gcc aac ggt tca 1039
 Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala Asn Gly Ser
 280 285 290
 tac agg ccc gag agt caa caa agt ggt ttt gat ccg cta caa agc ctc 1087
 Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu Gln Ser Leu
 295 300 305
 aac tac gga ata cct ccg ttt cag ctc gag gga aag gat ggt aat gga 1135
 Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp Gly Asn Gly
 310 315 320
 ttc ttc gac gac ttg agt tac ttg gat ctg gag aac taaacaaaac 1181
 Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn
 325 330 335
 aatatgaagc tttttggatt tgatatttgc cttaatccca caacgactgt tgattctccta 1241
 tccgagtttt agtgatalag agaactacag aacacgtttt ttcttggttat aaaggtgaac 1301
 tgtatataac gaaacagtga tatgacaata gagaagacaa ctatagtttg ttagtctgct 1361
 tctcttaagt tgttcttttag atatgtttta tgttttgtaa caacaggaat gaataataca 1421
 cacttgtaaa aaaaaa 1437

<:210>: 4

<:211>: 335

<:212>: PRT

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>: 4

Met Ala Val Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp

1 5 10 15

Thr Ser Arg Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val

20 25 30

Ala Glu Arg Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu

35 40 45

Val Ser Thr Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly

50 55 60
 Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg
 65 70 75 80
 Gly Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu
 85 90 95
 Pro Asn Arg Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln
 100 105 110
 Glu Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro
 115 120 125
 Leu Ala Arg Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser
 130 135 140
 Thr Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val
 145 150 155 160
 His Val Lys Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly
 165 170 175
 Gly Val Glu Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys
 180 185 190
 Arg Gly Val Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn
 195 200 205
 Tyr Trp Ser Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly
 210 215 220
 Ile Val Glu Thr Cys Gln Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala
 225 230 235 240
 Asp Tyr Gly Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser
 245 250 255
 Asp Met Phe Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp
 260 265 270
 Val Phe Ala Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala
 275 280 285
 Asn Gly Ser Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu
 290 295 300
 Gln Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp
 305 310 315 320
 Gly Asn Gly Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn
 325 330 335

<:210>: 5

<:211>: 937

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (164)..(802)

<:400>: 5

cttgaaaaag aatctacctg aaaagaaaaa aaagagagag agatataaat agctttacca 60
 agacagatat actatctttt attaatccaa aaagactgag aactctagta actacgtact 120
 acttaaacct tatccagttt cttgaaacag agtactctga tca atg aac tca ttt 175
 Met Asn Ser Phe

1

tca gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag cct caa ggc gga 223

```

Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Pro Gln Gly Gly
  5              10              15              20
gat tat tgt ccg acg ttg gcc acg agt tgt ccg aag aaa ccg gcg ggc 271
Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly
              25              30              35
cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt 319
Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg
              40              45              50
caa aga aac tcc ggt aag tgg gtt tct gaa gtg aga gag cca aac aag 367
Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys
              55              60              65
aaa acc agg att tgg ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct 415
Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala
              70              75              80
cgt gct cac gac gtc gct gca tta gcc ctc cgt gcc cga tca gca tgt 463
Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys
              85              90              95              100
ctc aac ttc gct gac tcg gct tgg cgg cta cga atc ccg gag tca aca 511
Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr
              105              110              115
tgc gcc aag gat atc caa aaa gcg gct gct gaa gcg gcg ttg gct ttt 559
Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe
              120              125              130
caa gat gag acg tgt gat acg acg acc acg aat cat gcc ctg gac atg 607
Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Thr Asn His Gly Leu Asp Met
              135              140              145
gag gag acg atg gtg gaa gct att tat aca ccg gaa cag agc gaa ggt 655
Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Glu Gly
              150              155              160
gcg ttt tat atg gat gag gag aca atg ttt ggg atg ccg act ttg ttg 703
Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met Pro Thr Leu Leu
              165              170              175              180
gat aat atg gct gaa gcc atg ctt tta ccg ccg ccg tct gtt caa tgg 751
Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro Ser Val Gln Trp
              185              190              195
aat cat aat tat gac gcc gaa gga gat ggt gac gtg tgg ctt tgg agt 799
Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val Ser Leu Trp Ser
              200              205              210
tac taatattcga tagtcgttcc catttttgta ctatagtttg aaaaattct 852
Tyr
agttcccttt tttagaatgg ttcccttcatt ttattttatt ttattgttgt agaaacgagt 912
ggaaaataat tcaatacaaa aaaaa 937
<:210>: 6
<:211>: 213
<:212>: PRT
<:213>: Arabidopsis thaliana
<:400>: 6
Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
  1              5              10              15
Pro Gln Gly Gly Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys

```

20 25 30
 Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg
 50 55 60
 Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala
 65 70 75 80
 Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly
 85 90 95
 Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile
 100 105 110
 Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala
 115 120 125
 Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Thr Asn His
 130 135 140
 Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met
 165 170 175
 Pro Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro
 180 185 190
 Ser Val Gln Trp Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val
 195 200 205
 Ser Leu Trp Ser Tyr
 210

<:210>: 7

<:211>: 944

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (135)..(782)

<:400>: 7

cctgaattag aaaagaaaga tagatagaga aataaatatt ttatcatacc atacaaaaaa 60
 agacagagat ctctacttta ctctactctc ataaacctta tccagtttct tgaacagag 120
 tactcttctg atca atg aac tca ttt tct gcc ttt tct gaa atg ttt ggc 170
 Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly
 1 5 10
 tcc gat tac gag tct ccg gtt tcc tca gcc ggt gat tac agt ccg aag 218
 Ser Asp Tyr Glu Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys
 15 20 25
 ctt gcc acg agc tgc ccc aag aaa cca gcc gga agg aag aag ttt cgt 266
 Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg
 30 35 40
 gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt caa aga aac tcc ggt 314
 Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly
 45 50 55 60
 aag tgg gtg tgt gag ttg aga gag cca aac aag aaa acg agg att tgg 362

Lys Trp Val Cys Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp
 65 70 75
 ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct cgt gct cac gac gtc 410
 Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val
 80 85 90
 gcc gcc ata gct ctc cgt ggc aga tct gcc tgt ctc aat ttc gct gac 458
 Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp
 95 100 105
 tcg gct tgg egg cta cga atc ccg gaa tca acc tgt gcc aag gaa atc 506
 Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile
 110 115 120
 caa aag gcg gcg gct gaa gcc gcg ttg aat ttt caa gat gag atg tgt 554
 Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys
 125 130 135 140
 cat atg acg acg gat gct cat ggt ctt gac atg gag gag acc ttg gtg 602
 His Met Thr Thr Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val
 145 150 155
 gag gct att tat acg ccg gaa cag agc caa gat gcg ttt tat atg gat 650
 Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp
 160 165 170
 gaa gag gcg atg ttg ggg atg tct agt ttg ttg gat aac atg gcc gaa 698
 Glu Glu Ala Met Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu
 175 180 185
 ggg atg ctt tta ccg tcg ccg tcg gtt caa tgg aac tat aat ttt gat 746
 Gly Met Leu Leu Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp
 190 195 200
 gtc gag gga gat gat gac gtg tcc tta tgg agc tat taaaattcga 792
 Val Glu Gly Asp Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
 205 210 215
 tttttatttc ctttttgggt attatagctt tttatacatt tgatcctttt ttagaatgga 852
 tctttcttctt tttttgggtg tgagaaacga atgtaaattg taaaagttgt tgtcaaatgc 912
 aaatgttttt gactgcagaa tatataatct tt 944
 <:210>: 8
 <:211>: 216
 <:212>: PRT
 <:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>: 8

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
 1 5 10 15
 Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys Leu Ala Thr Ser
 20 25 30
 Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His
 35 40 45
 Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys
 50 55 60
 Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe
 65 70 75 80
 Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Ile Ala
 85 90 95

Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile Gln Lys Ala Ala
 115 120 125
 Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys His Met Thr Thr
 130 135 140
 Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Ala Met
 165 170 175
 Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu
 180 185 190
 Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp Val Glu Gly Asp
 195 200 205
 Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
 210 215

<:210>: 9

<:211>: 1513

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (183)..(1172)

<:400>: 9

gagacgetag aaagaacgag aaagettgag aagaagattt gettttgatc gacttaacac 60
 gaacaacaaa caacatctgc gtgataaaga agagattttt gcttaaataa agaagagatt 120
 cgactetaat cctggagtta tcattcacga tagattctta gattgcgact ataaagaaga 180
 ag atg get gta tat gaa caa acc gga acc gag cag cag aag aaa agg 227
 Met Ala Val Tyr Glu Gln Thr Gly Thr Glu Gln Pro Lys Lys Arg
 1 5 10 15
 aaa tct agg get cga gca ggt ggt tta acg gtg get gat agg cta aag 275
 Lys Ser Arg Ala Arg Ala Gly Gly Leu Thr Val Ala Asp Arg Leu Lys
 20 25 30
 aag tgg aaa gag tac aac gag att gtt gaa get teg get gtt aaa gaa 323
 Lys Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Lys Glu
 35 40 45
 gga gag aaa cag aaa cgc aaa gtt cct gag aaa ggg teg aag aaa ggt 371
 Gly Glu Lys Pro Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly
 50 55 60
 tgt atg aag ggt aaa gga gga cca gat aat tct cac tgt agt ttt aga 419
 Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn Ser His Cys Ser Phe Arg
 65 70 75
 gga gtt aga caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gca gag att cga gaa 467
 Gly Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu
 80 85 90 95
 cag aaa ata gga act aga ctt tgg ctt ggt act ttt cct acc gag gaa 515
 Pro Lys Ile Gly Thr Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu
 100 105 110
 aaa get get tcc get tat gat gaa gag get acc get atg tac ggt tca 563

Lys Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Thr Ala Met Tyr Gly Ser
 115 120 125
 ttg gct cgt ctt aac ttc cct cag tct gtt ggg tct gag ttt act agt 611
 Leu Ala Arg Leu Asn Phe Pro Gln Ser Val Gly Ser Glu Phe Thr Ser
 130 135 140
 acg tct agt caa tct gag gtg tgt acg gtt gaa aat aag gcg gtt gtt 659
 Thr Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Asn Lys Ala Val Val
 145 150 155
 tgt ggt gat gtt tgt gtg aag cat gaa gat act gat tgt gaa tct aat 707
 Cys Gly Asp Val Cys Val Lys His Glu Asp Thr Asp Cys Glu Ser Asn
 160 165 170 175
 cca ttt agt cag att tta gat gtt aga gaa gag tct tgt gga acc agg 755
 Pro Phe Ser Gln Ile Leu Asp Val Arg Glu Glu Ser Cys Gly Thr Arg
 180 185 190
 ccg gac agt tgc acg gtt gga cat caa gat atg aat tct tgc ctg aat 803
 Pro Asp Ser Cys Thr Val Gly His Gln Asp Met Asn Ser Ser Leu Asn
 195 200 205
 tac gat ttg ctg tta gag ttt gag cag cag tat tgg ggc caa gtt ttg 851
 Tyr Asp Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu
 210 215 220
 cag gag aaa gag aaa ccg aag cag gaa gaa gag gag ata cag caa cag 899
 Gln Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln
 225 230 235
 caa cag gaa cag caa cag caa cag ctg caa ccg gat ttg ctt act gtt 947
 Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val
 240 245 250 255
 gca gat tac ggt tgg cct tgg tct aat gat att gta aat gat cag act 995
 Ala Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr
 260 265 270
 tct tgg gat cct aat gag tgc ttt gat att aat gaa ctc ctt gga gat 1043
 Ser Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp
 275 280 285
 ttg aat gaa cct ggt ccc cat cag agc caa gac caa aac cac gta aat 1091
 Leu Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn
 290 295 300
 tct ggt agt tat gat ttg cat ccg ctt cat ctc gag cca cac gat ggt 1139
 Ser Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly
 305 310 315
 cac gag ttc aat ggt ttg agt tct ctg gat att tgagagttct gaggcaatgg 1192
 His Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile
 320 325 330
 tctacaaga ctacaacata atctttggat tgatcatagg agaaacaaga aataggtgtt 1252
 aatgatctga ttcacaatga aaaaatattt aataacteta tagtttttgt tctttccttg 1312
 gateatgaac tgttgettct catctattga gttaatatag cgaatagcag agtttctctc 1372
 tttctctctt ttgtagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaah sakmabgar 1432
 sresdvsnaa nntnatnar sarchentrr agretrasen csreaswash tskbabarak 1492
 aantamaysa kmasrngnga c 1513
 <:210>: 10
 <:211>: 330
 <:212>: PRT

<:213>: *Arabidopsis thaliana*

<:400>: 10

Met Ala Val Tyr Glu Gln Thr Gly Thr Glu Gln Pro Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Arg Ala Arg Ala Gly Gly Leu Thr Val Ala Asp Arg Leu Lys Lys
 20 25 30
 Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Lys Glu Gly
 35 40 45
 Glu Lys Pro Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys
 50 55 60
 Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn Ser His Cys Ser Phe Arg Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro
 85 90 95
 Lys Ile Gly Thr Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu Lys
 100 105 110
 Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Thr Ala Met Tyr Gly Ser Leu
 115 120 125
 Ala Arg Leu Asn Phe Pro Gln Ser Val Gly Ser Glu Phe Thr Ser Thr
 130 135 140
 Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Asn Lys Ala Val Val Cys
 145 150 155 160
 Gly Asp Val Cys Val Lys His Glu Asp Thr Asp Cys Glu Ser Asn Pro
 165 170 175
 Phe Ser Gln Ile Leu Asp Val Arg Glu Glu Ser Cys Gly Thr Arg Pro
 180 185 190
 Asp Ser Cys Thr Val Gly His Gln Asp Met Asn Ser Ser Leu Asn Tyr
 195 200 205
 Asp Leu Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu Gln
 210 215 220
 Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val Ala
 245 250 255
 Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr Ser
 260 265 270
 Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp Leu
 275 280 285
 Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn Ser
 290 295 300
 Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly His
 305 310 315 320
 Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile
 325 330

<:210>: 11

<:211>: 30

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:220>:

<:223>: Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A

gene and having a HindIII site.

<:400>; 11

aagcttaagc ttacatcagt ttgaaagaaa

30

<:210>; 12

<:211>; 31

<:212>; DNA

<:213>; Artificial Sequence

<:220>;

<:223>; Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A

gene and having a HindIII site.

<:400>; 12

aagcttaagc ttgctttttg gaactcatgt c

31

【0109】

【フリーテキスト】

【0110】

【配列番号11】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド

【0111】

【配列番号12】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の遺伝子のスクリーニング方法の原理を示す図である。

【図2】DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合特性に関するゲルシフトアッセイの結果を示す写真である。

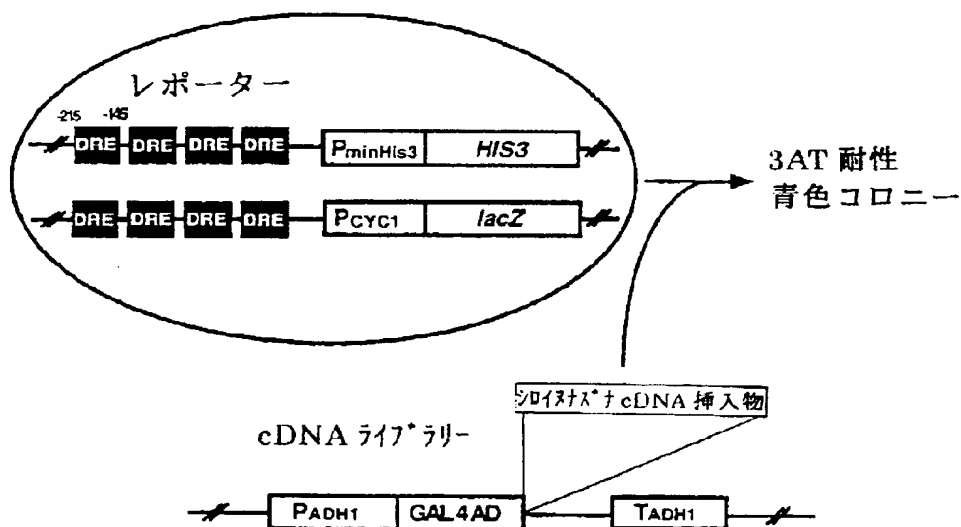
【図3】DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質の転写活性化能を示す図である。

【図4】植物導入用組換えプラスミドの構造を示す図である。

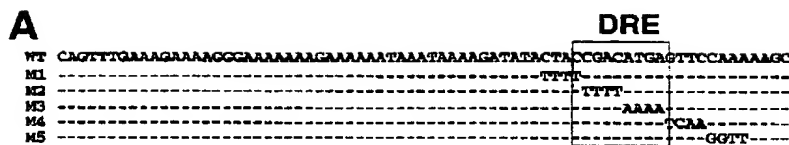
【図5】DREB1A遺伝子導入植物におけるストレス負荷時の各遺伝子の転写レベルを示す写真である。

【図6】DREB1A遺伝子導入植物の凍結ストレス又は乾燥ストレスを与えた場合の植物の生育を示した写真である。

【図1】

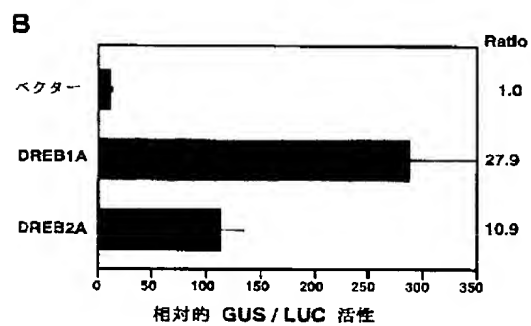
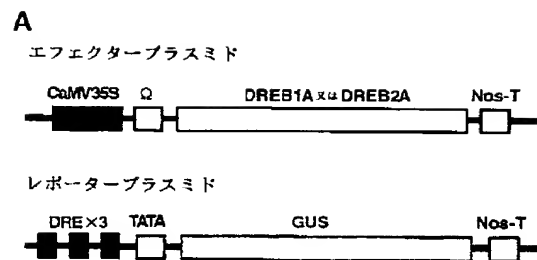


【図2】

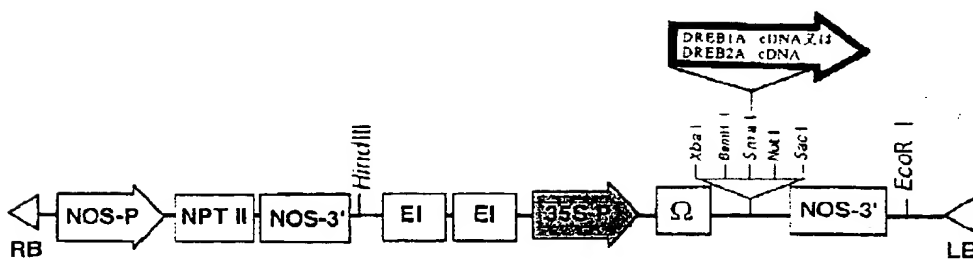
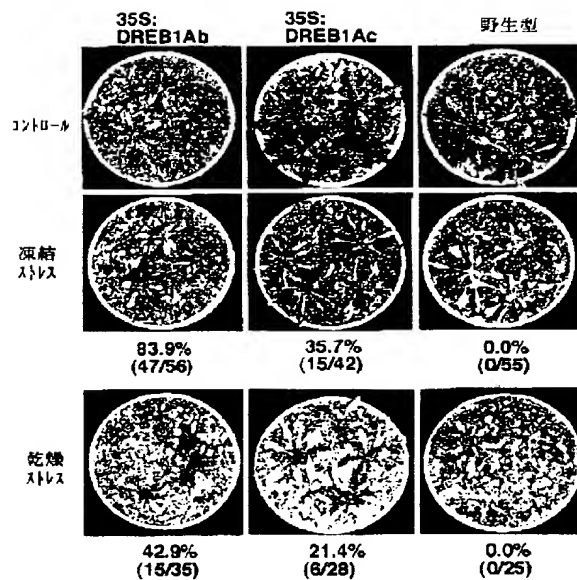


【図3】

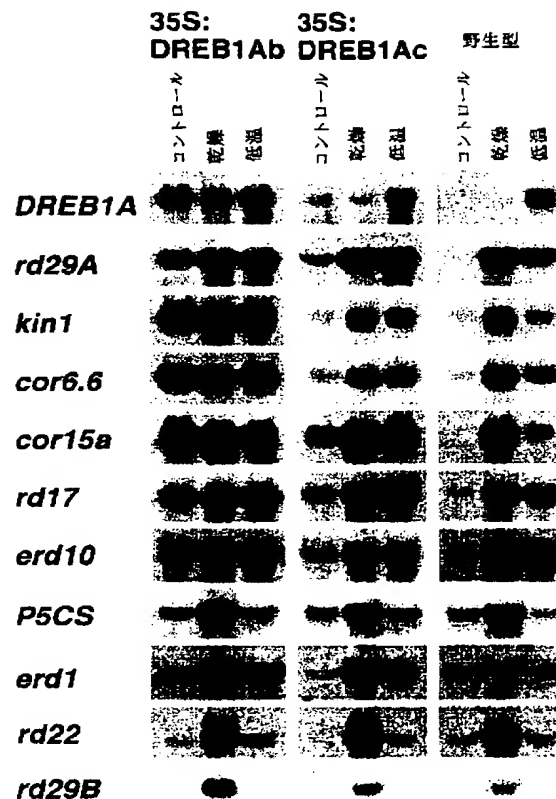
【図6】



【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成11年8月9日(1999.8.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号2又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2又は配列番号8で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質(CBF1タンパク質を除く)

【請求項2】ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする転写因子遺伝子。

(a) 配列番号2又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2又は配列番号8で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質(CBF1タンパク質を除く)

【請求項4】以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号1又は配列番号7で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1又は配列番号7で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNA(CBF1遺伝子を除く)

【請求項5】ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項3又は4記載の遺伝子。

【請求項6】以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつDRE下流の遺伝子の転写を活

性化するタンパク質 (C B F 1 タンパク質を除く)

【請求項7】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする、転写因子遺伝子、

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつDRE下流の遺伝子の転写を活性化するタンパク質

【請求項8】 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子、

(c) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつDRE下流の遺伝子の転写を活性化するタンパク質をコードするDNA (C B F 1 遺伝子を除く)

【請求項9】 請求項3～5、7及び8のいずれか1項に記載の遺伝子を含有する組換えベクター、

【請求項10】 請求項9記載の組換えベクターを含む形質転換体、

【請求項11】 請求項3～5、7及び8のいずれか1項に記載の遺伝子を含有するトランスジェニック植物、

【請求項12】 請求項10記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御又はDRE下流の遺伝子の転写を活性化するタンパク質を採取することを特徴とする、該タンパク質の製造方法、

【請求項13】 請求項3～5、7及び8のいずれか1項に記載の遺伝子の植物体内における転写レベルを測定することを特徴とする植物のストレスレベルの測定方法、

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:865)			
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:865)			

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA06 CA17
CA19 CB02 CD07 CD10
4B024 BA21 BA47 CA04 DA05 DA06
EA04 FA15 GA11 HA01
4B063 QA01 QQ04 QQ46 QR25 QR33
QS25 QS33
4B064 AG02 CA02 CA11 CA19 CC24
DA11
4B065 AA11X AA26X AA89X AA89Y
AB01 BA02 BA03 CA24 CA53
4H045 AA10 BA10 CA30 EA05 FA74